



**Diagnóstico do Potencial de Nitrificação e Desnitrificação  
em Solo sob Pastagens de *Bracharia* sp. e Solo sob Plantio  
Direto e Convencional**



**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**

**Agrobiologia**

Ministério da Agricultura e do Abastecimento

***República Federativa do Brasil***

***Presidente***

*Fernando Henrique Cardoso*

*Ministério da Agricultura e do Abastecimento*

***Ministro***

*Francisco Turra*

*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Embrapa*

***Diretor Presidente***

*Alberto Duque Portugal*

***Diretores***

*Elza Ângela Battaggia Brito da Cunha*

*Dante Daniel Giacomelli Scolari*

*José Roberto Rodrigues Peres*

***Chefias da Agrobiologia***

*Chefe Geral: Maria Cristina Prata Neves*

*Chefe Adj. De Pesq e Desenvolvimento: Sebastião Manhães Souto*

*Chefe Adjunto Administrativo: Vanderlei Pinto*

*DOCUMENTO Nº 78*

*ISSN 0104-6187*

*Novembro 1998*

**Diagnóstico do Potencial de Nitrificação e Desnitrificação  
em Solo sob Pastagens de *Bracharia sp.* e Solo sob Plantio  
Direto e Convencional**

*Alejandro López*

*Helenice Silva de Jesus*

*Mariana de Melo Rocha*

*Marcos Fries*

*Segundo Urquiaga*

*Bruno José Rodrigues Alves*

*Seropédica – RJ*

*1998*

*Exemplares desta publicação podem ser solicitadas à*

**Embrapa Agrobiologia**

Caixa Postal: 74505

23851-970 – Seropédica – RJ

Telefone: (021) 682-1500

Fax: (021) 682-1230

E-mail: sac@cnpab.embrapa.br

**Expediente:**

Revisor e/ou ad hoc: Sebastião Manhães Souto

Normalização Bibliográfica/Confecção/Padronização: Dorimar dos Santos Felix  
e/ou Sérgio Alexandre Lima

Comitê de Publicações: Sebastião Manhães Souto (Presidente)

Johanna Döbereiner

José Ivo Baldani

Norma Gouvêa Rumjanek

José Antonio Ramos Pereira

Paulo Augusto da Eira

Dorimar dos Santos Felix (Bibliotecária)

LÓPEZ, A.; JESUS, H.S. de; ROCHA, M. de M.; FRIES, M.; URQUIAGA, S.;  
ALVES, B.J.R. **Diagnóstico do potencial de nitrificação e desnitrificação  
em solo sob pastagens de *Bracharia sp.* e solo sob plantio direto e  
convencional.** Seropédica: Embrapa Agrobiologia, nov. 1998. 24p.  
(Embrapa-CNPAB. Documentos, 78).

ISSN 0104-6187

1. Solo. 2. Pastagem. 3. Plantio direto. 4. Nitrificação. 5. Desnitrificação. I. Jesus,  
H.S. de, colab. II. Rocha, M. de M., colab. III. Fries, M., colab. IV. Urquiaga, S.,  
colab. V. Alves, B.J.R., colab. VI. Embrapa. Centro Nacional de Pesquisa de  
Agrobiologia (Seropédica, RJ). VII. Título. VIII. Série.

CDD 631.4

# SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	4
1.2. <u>NITRIFICAÇÃO</u> .....	6
1.2. <u>DESNITRIFICAÇÃO</u> .....	7
1.3. <u>BIOMASSA MICROBIANA</u> .....	8
2. OBJETIVOS .....	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
3.1. <u>ENSAIO COM PLANTIO DIRETO E CONVENCIONAL</u> .....	13
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	15
4.1. <u>ENSAIO COM BRACHIARIA</u> .....	15
5. LITERATURA CITADA.....	22

# ***Diagnóstico do Potencial de Nitrificação e Desnitrificação em Solo sob Pastagens de Bracharia sp. e Solo sob Plantio Direto e Convencional***

*Alejandro López*<sup>1</sup>

*Helenice Silva de Jesus*<sup>1</sup>

*Mariana de Melo Rocha*<sup>1</sup>

*Marcos Fries*<sup>2</sup>

*Segundo Urquiaga*<sup>3</sup>

*Bruno José Rodrigues Alves*<sup>3</sup>

## **1. INTRODUÇÃO**

Atualmente no Brasil existem ao redor de 60 milhões de hectares sob pastagens cultivadas, sendo a maioria braquiárias. No início da década de 70, a espécie mais dominante foi *Brachiaria decumbens* e logo ingressaram *B. humidicola* e *B. brizantha*, entre as principais. Considera-se que ao redor de 5 % destas áreas mostram sinais claros de degradação, o que é atribuído à diminuição do N disponível no solo (Myers & Robbins, 1991; Macedo, 1993).

Algumas espécies de gramíneas mostram declínio da produtividade depois de poucos anos de cultivo, enquanto outras, na mesma área, mantêm uma boa produtividade pelo mesmo tempo. Como as condições são as mesmas, poderiam ser esperadas diferenças com relação à eficiência no uso de N disponível, resultante de diferentes capacidades de assimilação e consumo, além da capacidade de obter diferentes fontes de N. Poucos são os estudos feitos a este respeito com diferentes espécies de pastagens em solo de cerrado. Existem estudos sugerindo que as plantas estimulariam a mineralização de N orgânico pela exudação de compostos orgânicos pelas raízes. Espécies com tal potencial teriam vantagens em obter N,

---

<sup>1</sup> Alunos do XII Curso Intensivo sobre FBN realizado em Julho/98. EMBRAPA Agrobiologia. Seropédica-RJ.

<sup>2</sup> Professor Adjunto do Dpto. de Solos, Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria-RS.

<sup>3</sup> Pesquisadores da EMBRAPA Agrobiologia. Seropédica-RJ.

enquanto outras espécies, explorando os mesmos recursos não são capazes de fazê-lo.

Sabendo que o húmus é um material de difícil decomposição, a comunidade microbiana consumirá primeiro compostos mais facilmente degradados para obterem a energia necessária para seu metabolismo. Em uma situação onde as condições são todas favoráveis, mas a única fonte de nutriente disponível é o húmus, a atividade microbiana será mínima, sendo que vários microrganismos estarão presentes em formas dormentes ou esporuladas (condições de subsistência). No instante em que resíduos orgânicos (animais ou vegetais) são adicionados ao solo, a atividade e o número de microrganismos aumenta, uma vez que estamos fornecendo uma fonte de carbono e energia prontamente assimilável. Desse modo, podemos medir a atividade microbiana pela quantidade de CO<sub>2</sub> liberado durante o processo respiratório. Em experimento, sob condições de laboratório, o CO<sub>2</sub> liberado pode ser capturado e medido usando uma solução alcalina, como por exemplo, uma solução de NaOH que captura o gás, de modo que possamos quantificá-lo através de titulação com HCl.

É conveniente ressaltar que a avaliação da quantidade de CO<sub>2</sub> liberado ou de O<sub>2</sub> consumido pode dar uma boa idéia do comportamento da comunidade microbiana do solo, mas não pode permitir a avaliação de alterações qualitativas que porventura venham ocorrer. Esta parece ser a maior limitação desta técnica, pois os compostos orgânicos adicionados não afetam de maneira uniforme todas as espécies de microrganismos do solo, podendo levar a drásticas alterações em algumas populações, mesmo que a liberação de CO<sub>2</sub> ou o consumo de O<sub>2</sub> não sejam sensivelmente afetados.

A composição dos resíduos orgânicos frescos adicionados ao solo, bem como a relação C/N afetarão o balanço de mineralização/imobilização de N do solo. Alta relação C/N de um material facilmente decomponível resultará em imobilização (incorporação nos compostos nitrogenados constituintes dos microrganismos), ao passo que a mineralização ocorrerá quando os resíduos adicionados ao solo tiverem baixa relação C/N (Janssen, 1996).

A umidade do solo é outro fator que influencia estes processos, uma vez que correlaciona-se diretamente com a quantidade de O<sub>2</sub> disponível, ou seja,

determina se prevalecem condições aeróbias ou anaeróbias e, com isso, o tipo de metabolismo energético a ser utilizado pela comunidade microbiana. Condições de anaerobiose diminuem a atividade microbiana pois somente um grupo restrito de microorganismos estará atuando (Fries, comunicação pessoal).

Em um ambiente tão complexo quanto o do solo, onde tratos culturais e manejos das culturas (Castro, 1989; Muzilli, 1983) influenciam continuamente as condições de umidade, temperatura, aeração, reações do solo, disponibilidade de nutrientes, etc., entende-se que a comunidade microbiana aí presente é regida fortemente por estas condições ambientais, bem como por compostos adicionados, podendo, deste modo, ser afetada tanto qualitativa quanto quantitativamente. Alterações provocadas pelo plantio direto e sistemas de rotação de culturas podem afetar as populações desnitrificadoras e também outros microorganismos do solo.

As pesquisas relacionadas com modificações provocadas nos solos pelos efeitos de manejos agrícolas estão voltadas principalmente para suas características físicas e químicas. No entanto, o sistema de cultivo pode também afetar as propriedades biológicas que estão, direta ou indiretamente, relacionadas à ciclagem e disponibilidade de nutrientes, atividade microbiana e desenvolvimento de raízes (Carter, 1986).

## **1.2. Nitrificação**

Nas últimas décadas, a maior parte das pesquisas sobre os processos de transformação de nitrogênio no solo, principalmente no Brasil, têm sido voltadas à fixação biológica de  $N_2$ ; pouca atenção tem sido dada aos demais processos microbiológicos de transformação deste elemento no solo.

Dos microrganismos do solo, os mais importantes do ponto de vista das transformações do nitrogênio são fungos e bactérias. Os fungos, por não possuírem clorofila, dependem de carbono orgânico pré-formado para suas sínteses celulares. Além disso, usam, preferencialmente, amônia ou nitrato como fonte de nitrogênio, embora possam também metabolizar proteínas, ácidos nucléicos e outros complexos orgânicos. As bactérias, por sua vez, também atuam na decomposição da matéria orgânica e são as principais responsáveis pelos processos de nitrificação e desnitrificação (Cardoso et al., 1992).



O processo de transformação do nitrogênio orgânico em  $\text{N-NH}_4^+$  é chamado mineralização ou amonificação, e a nitrificação, refere-se à oxidação de  $\text{NH}_4^+$  para nitrato. A nitrificação é um bom indicador da atividade biológica e fertilidade do solo. É um processo sensível às alterações do ambiente, e pode ser medido com razoável precisão e, por isso, tem sido bastante usado para avaliar os efeitos de vários poluentes químicos na biologia do solo. Deve-se salientar, porém, que uma redução na nitrificação não é de todo indesejável, por permitir uma maior manutenção do nitrogênio na superfície do solo, já que o íon amônio pode ser adsorvido por seus colóides (Victoria et al., 1992).

O processo de nitrificação é constituído por duas etapas: 1) nitritação, correspondente à formação de  $\text{NO}_3^-$  a partir de amônio, mediado por microorganismos dos gêneros Nitrossomonas, Nitrospira, Nitrosococcus e Nitrosolobus e 2) nitratação, onde o  $\text{NO}_2^-$  é transformado em  $\text{NO}_3^-$  por microorganismos tais como Nitrobacter, Nitrospirina e Nitrococcus. Sendo que o nitrito, produto intermediário neste processo raramente acumula-se em concentrações detectáveis.

## **1.2. Desnitrificação**

A desnitrificação é um dos três mais importantes processos de perda de nitrato que ocorre no solo, sendo que os outros dois são assimilação pela planta e lixiviação. É realizado por microorganismos capazes de utilizar nitrato ou nitrito como aceptores finais de elétrons na cadeia respiratória, em ambiente ausente de oxigênio, mas parece ser significativamente limitado e é rapidamente inibido por baixas concentrações de  $\text{N-NH}_4^+$  ou N orgânico (Rice & Tiedje, 1989).

Além de causar perda do N disponível para a cultura, o processo de desnitrificação, é um potencial contaminante do ambiente, visto que o  $\text{N}_2\text{O}$  (importante produto intermediário do processo) é um dos gases envolvidos na destruição da camada de ozônio (Crutzen, 1981). Estima-se que 70% das emissões de  $\text{N}_2\text{O}$ , sejam provenientes de atividade antrópica (Kroeze, 1993). Em determinados sistemas agrícolas, onde se favorece o processo de desnitrificação, as

estimativas de perdas de nitrogênio variam em função da umidade do solo e, giram em torno de 20-30% do aplicado (Fries, comunicação pessoal).

Entre os gêneros de bactérias que possuem a capacidade de desnitrificar pode-se citar: *Alcaligenes*, *Agrobacterium*, *Rizobium*, *Pseudomonas*, *Thiobacillus*, *Azoarcus* e *Bacillus*.

A formação de N<sub>2</sub> a partir do NO<sub>3</sub><sup>-</sup> apresenta compostos intermediários:



### **1.3. Biomassa microbiana**

A biomassa microbiana do solo possui um papel fundamental na manutenção e produtividade de agroecossistemas, pois constitui um meio de transformação para todos os materiais orgânicos do solo, além de atuar como reservatório de nutrientes para as plantas (Jenkinson & Ladd, 1981). O reconhecimento da importância da comunidade microbiana do solo tem levado a um aumento no interesse em se avaliar os nutrientes contidos nas células microbianas, tais como C e N. Sua estimativa fornece dados úteis sobre as alterações decorrentes do uso do solo, visto que respondem com maior rapidez a essas variações do que parâmetros físicos e químicos, tais como pH e qualidade da matéria orgânica do solo (Powlson et al., 1987).

Os valores de biomassa microbiana de C indicam o potencial atividade microbiana no solo que pode estar participando do processo de decomposição de resíduos e liberação de nutrientes no solo. A biomassa microbiana de N constitui uma parte significativa e, do N potencialmente mineralizável disponível para as plantas. No entanto, em solos com baixos teores de N, o N contido na biomassa irá preferencialmente ser utilizado pelos microrganismos na decomposição da matéria orgânica, ficando imobilizado, diminuindo sua disponibilidade para as plantas (Paul & Clark, 1989).

A importância da qualidade da biomassa microbiana deve-se à conveniência de usá-la como um índice sensível das alterações edáficas oriundas de determinados manejos, pois trata-se do compartimento mais rápido de “turnover”

da matéria orgânica do solo. Contudo, esses resultados isoladamente não expressam a dinâmica de C e N do solo. Dados de biomassa microbiana devem estar sempre associados a dados de C orgânico e N total, além da atividade respiratória do solo, para que forneçam índices úteis na avaliação da dinâmica da matéria orgânica (Gama-Rodrigues et al., 1994).

Dos métodos disponíveis para estimar biomassa microbiana de C, o da fumigação-incubação (Jenkinson & Powlson, 1976) e o da fumigação-extração (Vance et al., 1987 e Tate et al., 1988 para carbono e Brookes et al., 1985, para nitrogênio) têm sido os mais utilizados. No entanto, a confiabilidade destes métodos é bastante questionável, visto que a estimativa da biomassa microbiana pode ser afetada pelas condições experimentais.

O método da fumigação-extração para análise da biomassa microbiana de carbono foi introduzido por Vance et al. (1987). Logo depois, Sparling & West (1988) e Tate et al. (1988) utilizaram-no em diferentes solos, levando-os a propor um fator de eficiência da extração, para o cálculo da biomassa microbiana, que varia conforme o tipo de solo. Este método foi proposto como alternativa às limitações do fumigação-incubação, e possibilitar rapidez na obtenção de resultados e praticidade durante sua execução.

## **2. OBJETIVOS**

Estudar em solo podzólico Vermelho-Amarelo sob quatro espécies de *Brachiaria*, a potencialidade de mineralização, nitrificação e desnitrificação.

Avaliar microorganismos diazotróficos presentes no solo da rizosfera e nas raízes de quatro espécies de *Brachiaria* crescendo em solo podzólico Vermelho-Amarelo.

Analisar a influência da adição de diferentes resíduos de colheita e N mineral na biomassa microbiana de um solo procedente de área de plantio direto e convencional.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### Ensaio com *Brachiaria*

Em experimento conduzido sob condições de laboratório, com delineamentos inteiramente casualizados, utilizou-se solo Podzólico Vermelho Amarelo, cujas características químicas podem ser vistas na Tabela 1.

Coletaram-se amostras da camada superficial do solo (0-10cm) sob quatro espécies de *Brachiaria*, a saber: *B. decumbens*, *B. humidicola*, *B. brizantha* e *B. radicans*, logo após, o solo com umidade natural foi peneirado (2 mm), mediu-se o teor de umidade e as amostras foram, então, processadas.

**Tabela 1:** Características químicas do solo.

Tratam.	pH	Al	Ca+Mg	P	K	% C	M.O.	Ntotal
		Meq/100 mL		Ppm			%	
<i>B. radicans</i>	4,9	0,2	4,25	5,5	80	0,86	1,480	0,084
<i>B. brizantha</i>	5,0	0,2	4,20	7,5	106	0,6	1,035	0,084
<i>B. decumbens</i>	5,1	0,1	4,30	7,0	108	0,77	1,330	0,084
<i>B. humidicola</i>	5,5	0,0	4,00	7,0	79	0,89	1,470	0,084

Neste ensaio, os parâmetros avaliados foram potencial de nitrificação e de desnitrificação, biomassa microbiana de C e N e contagem de microorganismos fixadores de nitrogênio.

O termo potencial de nitrificação tem sido aplicado para medidas de taxas de nitrificação obtidas em condições de laboratório, sabendo que o processamento das amostras para incubação, incluindo peneiramento, secagem, armanezagem, etc., perturbam as amostras. Essas perturbações, combinadas com as condições de incubação (temperatura, umidade, etc.) são diferentes daquelas encontradas no campo, assim sendo, resultando em taxas de nitrificação também diferentes (Hart et al., 1994). Nesse sentido, o termo potencial de nitrificação não necessariamente quantifica a taxa máxima de nitrificação encontrada no campo, mas sim, aquela definida pelas condições de incubação. Sabendo disso, analisou-se o potencial nitrificador, utilizando 2 erlenmeyers de 250 mL contendo 50 g de solo, adicionado de 1 mL de solução de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (25 mg/L) e água suficiente para elevar a umidade a capacidade de campo. Em outros dois erlenmeyers foi realizado

o mesmo procedimento sem o acréscimo de fonte de nitrogênio. Os frascos foram vedados e incubados à 30° C, no escuro, durante 2 semanas. Após incubação, fez-se extração com KCl 2N (relação 3:1) e o extrato foi analisado para nitrato e amônio, pelo método do FIA, de acordo com Andrade et al. (1994).

Fez-se também a determinação do potencial de desnitrificação utilizando amostras de 25 g do mesmo solo adicionadas de 3 mL de uma solução nutritiva (2,5g de caldo nutritivo e 1,5g de KNO<sub>3</sub>), incubadas em erlenmeyer de 125 mL, com três repetições para cada amostra. Os erlenmeyers foram vedados com subba-seal e, por 4 vezes consecutivas, procedeu-se ciclo de vácuo alternado de injeção de gás hélio, para ter o sistema livre de O<sub>2</sub>. Posteriormente injetou-se 10% de acetileno na atmosfera do erlenmeyer, sabendo que o acetileno inibe a redução enzimática do N<sub>2</sub>O para N<sub>2</sub> e que, geralmente, 1 a 10% do volume é necessário para que isto ocorra. Assim, a desnitrificação pode ser medida pela quantidade de N<sub>2</sub>O produzida em solos tratados com acetileno. A porcentagem de perda de N como N<sub>2</sub>O e como N<sub>2</sub> pode ser estimada pela quantidade de N<sub>2</sub>O emitido do solo, adicionado ou não de nitrogênio.

Os erlenmeyers foram incubados à 30°C, no escuro durante 4 dias, e amostras de sua atmosfera foram tomadas nos tempos 1, 24, 72 horas da incubação. As análises foram realizadas em cromatografia gasosa utilizando coluna de Porapak Q 100-120 mesh, N<sub>2</sub>, forno 60°C, injetor 120°C e detector 375°C.

Realizou-se contagem de UFC (unidade formadora de colônia) de microorganismos fixadores de nitrogênio (diazotróficos), presentes no solo (rizosfera) e na raiz das plantas, para tanto, utilizou-se o método de plaqueamento "spread", em meio Thornton modificado: 1g de glicose, 1g de manitol, 1g de malato, 10 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (10%), 2 mL MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O (10%), 10 mL de CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (10%), 1mL de NaCl (10%), 0,2 mL de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O (1%), ciclohexamida (150 mg/L) e 12 g de agar, pH 7,4.

Ao se proceder a diluição das amostras de solo, pesou-se 10 g e diluiu-se em 90 mL de solução salina (0,9 %) sucessivamente até 10<sup>-8</sup>. As raízes, após lavagem em água corrente, foram pesadas e trituradas com 90 mL de solução salina (0,9 %) em liquidificador, obtendo-se assim, uma suspensão que correspondeu à diluição 10<sup>-1</sup>, a partir da qual realizou-se diluições sucessivas. Alíquotas de 0,1 mL

das diluições 10<sup>-3</sup> a 10<sup>-6</sup>, das amostras de solo e raiz, foram transferidas para placas de Petri contendo o meio de cultura específico solidificado. Para cada amostra utilizou-se três repetições. As placas foram incubadas à 30°C, no escuro, durante 5 dias.

Para quantificação da biomassa microbiana, pesou-se 20 g de solo úmido em frascos snap-cap (capacidade: 100-150 mL), com quatro repetições para cada tratamento. As amostras não-incubadas foram extraídas com K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no mesmo dia (tempo 0), sendo o filtrado guardado em geladeira, em frascos de vidro com tampa até que se processasse a análise. As amostras e dois outros frascos contendo apenas 60 mL de K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (branco), foram fumigadas com 20 mL de clorofórmio livre de etanol, ficando durante 24 horas em contato com o vapor fumigante. Fez-se vácuo no dessecador com bomba e, após, incubou-se a 30° C, no escuro, durante 10 dias. Ao final do período de incubação, a válvula do dessecador foi aberta para permitir a entrada de ar. Novamente, fez-se vácuo no dessecador, intercalando com aberturas da válvula, várias vezes consecutivamente, até que não mais se percebesse o cheiro de clorofórmio das amostras de solo.

Em cada uma das amostras de solo, fumigadas ou não, adicionou-se 60 mL de sulfato de potássio 2M e agitou-se por 30 minutos em agitador horizontal a 220 rpm, no próprio frasco usado para a incubação. Deixou-se decantar por 30 minutos e filtrou-se o sobrenadante em papel de filtro (Whatman 42). O filtrado foi recolhido em frascos de vidro, fechados e armazenados em geladeira. As análises de C e N do filtrado, das amostras fumigadas e não-fumigadas foram realizadas no mesmo dia.

O C orgânico no extrato foi determinado por digestão do filtrado com 2 mL de dicromato de potássio e 15 mL de uma mistura de duas partes de ácido sulfúrico e uma parte de ácido fosfórico. A mistura final foi fervida ligeiramente durante 20 minutos e após resfriamento, o excesso de dicromato foi determinado por titulação com sulfato ferroso amoniacal usando fenolftaleína, como indicador do ponto de viragem.

O N orgânico do extrato das amostras de solo foi determinado pelo método de Kjeldahl.

A biomassa microbiana de C e N das amostras de solo foi quantificada utilizando as fórmulas abaixo:

$$\text{Biomassa de C} = \text{EC}$$

$$\text{Biomassa de N} = \text{EN} \cdot 14 \cdot \text{NHCl} / \text{g}$$

Onde, EC é a fração de C encontrada no extrato liberado pelo clorofórmio (fumigado – não-fumigado), EN é a fração de N encontrada no extrato liberado pelo clorofórmio (amostra fumigada – amostra não-fumigada), 14 é o peso molecular do nitrogênio, NHCl = normalidade do ácido usada para titular o extrato e g = peso seco da amostra de solo.

### **3.1. Ensaio com plantio direto e convencional**

O experimento foi desenvolvido em condições de laboratório e constou de 8 tratamentos (com 3 repetições), a saber: testemunha; adição de 0,06 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (150 mg/N); adição de 0,06 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (150 mg/N) + 0,32 g de glicose (1600  $\mu\text{g}$  de C/g); adição de 0,35 g de  $\text{KNO}_3$  (150 mg/N) + 0,32 g de glicose (1600  $\mu\text{g}$  de C/g); adição de 0,35 g de  $\text{KNO}_3$  (150 mg/N) + atmosfera de He + 10% de acetileno; adição de 0,8 g de palha de aveia (4200  $\mu\text{g}$  de C/g); adição de 0,06 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (150 mg/N) + 0,8 g de palha de aveia (4200  $\mu\text{g}$  de C/g); adição de 0,8 g de palha de ervilhaca (4200  $\mu\text{g}$  de C/g) e branco (frasco sem solo). Todos os tratamentos tinham 80 g de solo umedecidos à capacidade de campo.

O solo utilizado foi classificado como Latossolo Vermelho Escuro, textura argilosa, coletado em Uberlândia-MG (Brasil), sob 3 anos de plantio direto com reversão para plantio convencional (primeiro ano).

As características químicas do solo são as seguintes: Plantio Direto: pH 5,9; P=11,5  $\mu\text{g/g}$ ; K=1,565  $\mu\text{g/g}$ ; Ca=30,75 mmolc/dm<sup>3</sup>; Mg=9,75 mmolc/dm<sup>3</sup>; CTC=65; V(%)=63,75; M.O. = 40,75 g/kg. Plantio convencional: pH 5,8; P=7,7  $\mu\text{g/g}$ ; K=1,87  $\mu\text{g/g}$ ; Ca=32 mmolc/dm<sup>3</sup>; Mg=9,0 mmolc/dm<sup>3</sup>; CTC=60; V(%)=71; M.O. = 41 g/kg

Os parâmetros analisados foram liberação de CO<sub>2</sub> do solo, contagem do número de células viáveis de microrganismos desnitrificadores (NMP), N<sub>2</sub>O produzido e níveis de nitrato e amônio do solo.

Para acompanhamento de CO<sub>2</sub> liberado, amostras de 80 g de solo seco, peneirado a 2 mm, foram incubadas junto com um frasco contendo 10 mL de NaOH 1N, em jarros de tampa rosqueável, com capacidade volumétrica de 3 L, no escuro, a 30° C.

Após o período de incubação, renovou-se a solução de NaOH de cada jarro, adicionou-se nesta, 2,5 mL de BaCl<sub>2</sub> 2N, a fim de precipitar o Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> formado. A seguir, as amostras de soda foram tituladas com HCl 0,5N, usando como indicador do ponto de viragem (rosa para branco leitoso), cinco gotas de solução alcoólicas de fenolftaleína.

Determinou-se o CO<sub>2</sub> desprendido do solo, através da aplicação da seguinte equação:  $\text{mg C.g}^{-1} \text{ de solo} = (V_b - V_a) \cdot N \cdot 6$

onde: V<sub>b</sub> = volume, em mL, de HCl gasto para titular NaOH do branco

V<sub>a</sub> = volume, em mL, de HCl gasto para titular cada amostra

N = normalidade do ácido usado

6 = peso equivalente do carbono

Para acompanhamento do CO<sub>2</sub> liberado, as leituras foram feitas aos 0, 1, 3, 5 e 7 dias de incubação.

As populações de microrganismos desnitrificantes foram quantificadas através do método do Número Mais Provável (NMP) (Cochran, 1950), a partir de amostras compostas de solo procedeu-se as diluições seriadas, utilizando-se o seguinte meio de cultivo: 8 g de caldo nutritivo, 0,5 g de NO<sub>3</sub> e 1000 mL de água destilada.

Os resultados do Número Mais Provável de microrganismos desnitrificantes foram calculados usando a tabela de probabilidade de DeMan (1983) e foram expressos por grama de solo seco.

Dez gramas de cada amostra composta de solo foram diluídas em erlenmeyer de 250 mL contendo 90 mL de solução salina 9% esterilizada. A partir desta diluição (10<sup>-1</sup>) inocularam-se 5 séries de diluição, cada série de 10<sup>-2</sup> a 10<sup>-9</sup>,



dispostas em 40 tubos de ensaio contendo meio de cultura e um tubo de ensaio de menor tamanho, colocado de cabeça para baixo para que capturasse o gás produzido pelas populações desnitrificantes. Os tubos continham 9 mL de meio de cultura e, ao serem inoculados com 1 mL da diluição 10<sup>-1</sup> de solo foram, além de frascos de diluição seriada, o meio de crescimento dos grupos microbianos em análise. Ao final do período de incubação, após leitura do NMP uma alíquota do meio de cultura foi retirada e analisada para nitrato através do método FIA (Andrade et al., 1994).

Os tubos de ensaio contendo meio de cultura, depois de transferidos com alíquotas de 1,0 mL da suspensão de solo, foram incubados, no escuro, a 30° C, durante 11 dias.

Os jarros com o tratamento solo a 80% da capacidade de campo + 0,35 g de KNO<sub>3</sub> + atmosfera de He + 10% de acetileno, foram incubados no escuro, após realizações de 3 vácuos sucessivos e sua atmosfera ter sido trocada por Hélio, além disso, adicionou-se 30 mL de acetileno (para que N<sub>2</sub>O se acumulasse, uma vez que o acetileno impede a formação de N<sub>2</sub>). A quantificação do N<sub>2</sub>O formado foi feita usando cromatografia gasosa (equipamento modelo XL-Perkin Elmer), equipada com detector de captura de elétrons (DCE), cujas condições de uso foram pré-estabelecidas como sendo: temperatura do forno de 60° C, temperatura de injeção, 120° C, temperatura do detector, 375° C e fluxo do carreador de 35 mL/min, descritas por Moiser & Mack (1980).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Ensaio com *Brachiaria*

*B. radicans* foi a gramínea utilizada como referência neste estudo, considerando ser esta uma pastagem muito exigente em N disponível. No que diz respeito aos parâmetros de biomassa microbiana, observou-se sensíveis diferenças em C microbiano, variando de 315 a 540 mg de C-microbiano.g<sup>-1</sup> de solo (Tabela 1), onde os valores mais altos corresponderam ao solo sob *B. humidicola*, que superou em cerca de 19 % a testemunha (*B. radicans*).

**Tabela 1.** Biomassa microbiana, quantificada pelo conteúdo de C e N, em solo extraído da rizosfera de *Brachiaria*.

<b><i>Biomassa Microbiana</i></b>			
	C	N	C:N
	( $\mu\text{g} / \text{g solo}$ )	( $\mu\text{g} / \text{g solo}$ )	
<b><i>B. brizantha</i></b>	314.7	48.5	6.5
<b><i>B. radicans</i></b>	451.6	75.6	6.0
<b><i>B. decumbens</i></b>	417.1	56.3	7.4
<b><i>B. humidicola</i></b>	539.7	74.2	7.3

Quanto a N microbiano, os valores encontrados variaram entre 48 a 76 mg de N.g<sup>-1</sup>, sendo que o valor mais alto foi encontrado em *B. radicans*, que no campo vem apresentando o crescimento mais pobre. Como os valores de C microbiano encontrados neste trabalho foram elevados, poderia se deduzir que grande parte do N potencialmente disponível às plantas estaria imobilizado na biomassa microbiana. Este mesmo comportamento tem sido observado em solos de cerrado sob pastagem degradada de *Brachiaria* (Urquiaga, comunicação pessoal).

Os dados da relação C/N da biomassa microbiana (Tabela 2), estiveram ao redor de 6,79 com mínima variação entre os tratamentos, o que indica que a comunidade microbiana nos diferentes tratamentos era bastante semelhante. Isto poderia ser corroborado, em parte, pelos resultados da avaliação da população de diazotróficos, no solo e nas raízes das plantas, dos diferentes tratamentos, onde não foram encontradas diferenças marcantes entre as espécies, tanto no solo (0,3 a 6,0.10<sup>7</sup> UFC) quanto nas raízes (0,3 a 4.10<sup>6</sup> UFC).

**Tabela 2.** Número de bactérias diazotróficas (UFC) de solo e raiz avaliadas por contagem em placas.

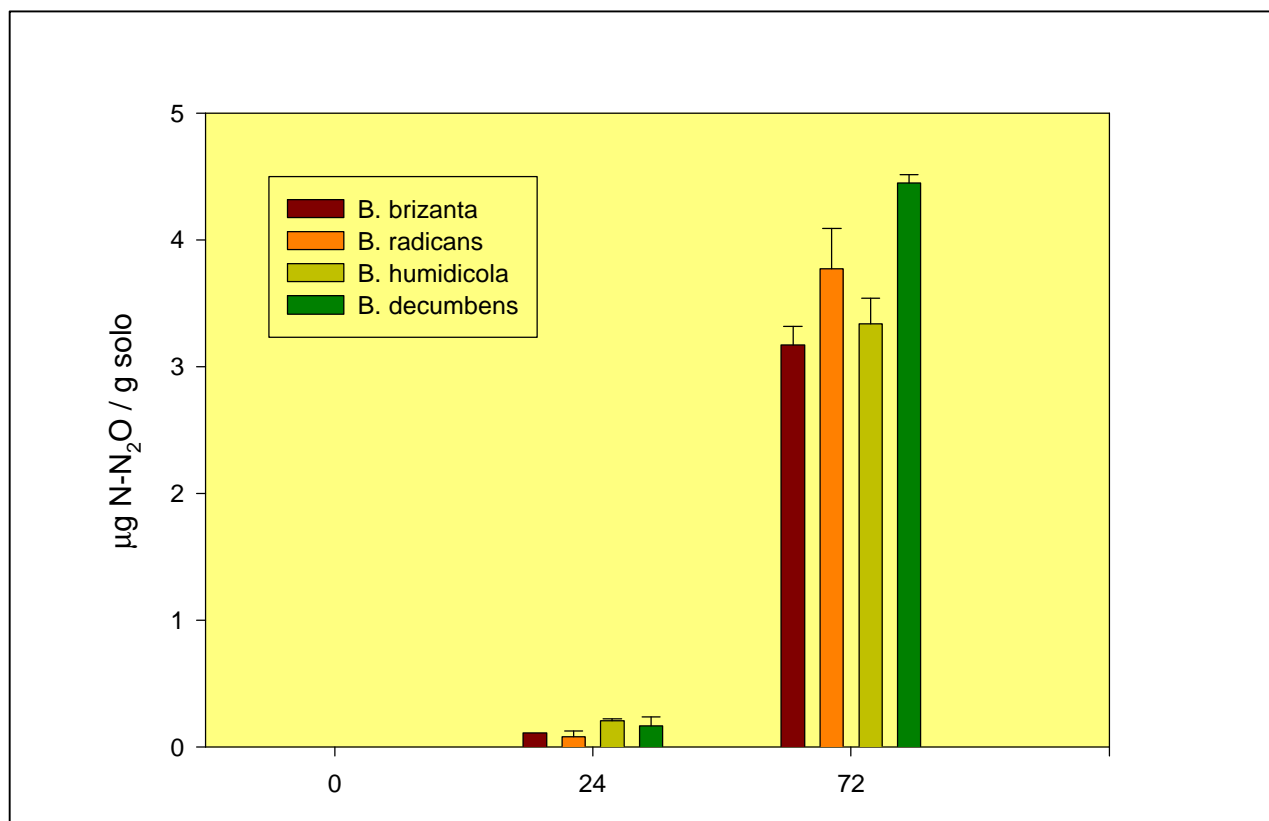
<b>Colonias (UFC)</b>		
	Solo ( $\times 10^7$ )	Raíz ( $\times 10^6$ )
<b><i>B. brizantha</i></b>	1.0	0.5
<b><i>B. radicans</i></b>	0.5	0.3
<b><i>B. decumbens</i></b>	0.3	0.5
<b><i>B. humidicola</i></b>	6.0	4.0

Observando a Figura 3, do potencial de nitrificação no solo extraído da zona de influência das raízes encontrou-se que o potencial de nitrificação nos tratamentos *B. brizantha*, *B. radicans* e *B. humidicola* aumentou sensivelmente, acompanhando o comportamento do C da biomassa microbiana que também aumentou no mesmo sentido. Tal fato somente não foi observado para *B. decumbens* que, apesar de apresentar valores de biomassa microbiana médios (C-, N-microbiano) em relação às demais espécies, a taxa de nitrificação neste tratamento, foi praticamente nula.



**Figura 1.** Nitrificação potencial em solos extraídos da rizosfera de quatro espécies de Brachiaria.

Por outro lado, o potencial de desnitrificação (Figura 2), apresentou um comportamento, que no geral, tendeu ao oposto do observado para o potencial de nitrificação, onde claramente destaca-se a influência de *B. decumbens* com o mais alto potencial de desnitrificação. Para este fato, não se tem uma explicação clara, mas poderia se pensar que *B. decumbens* condiciona o desenvolvimento de uma comunidade microbiana desnitrificante.



**Figura 2.** Desnitrificação potencial de solos extraídos da rizosfera de quatro espécies de *Brachiaria*.

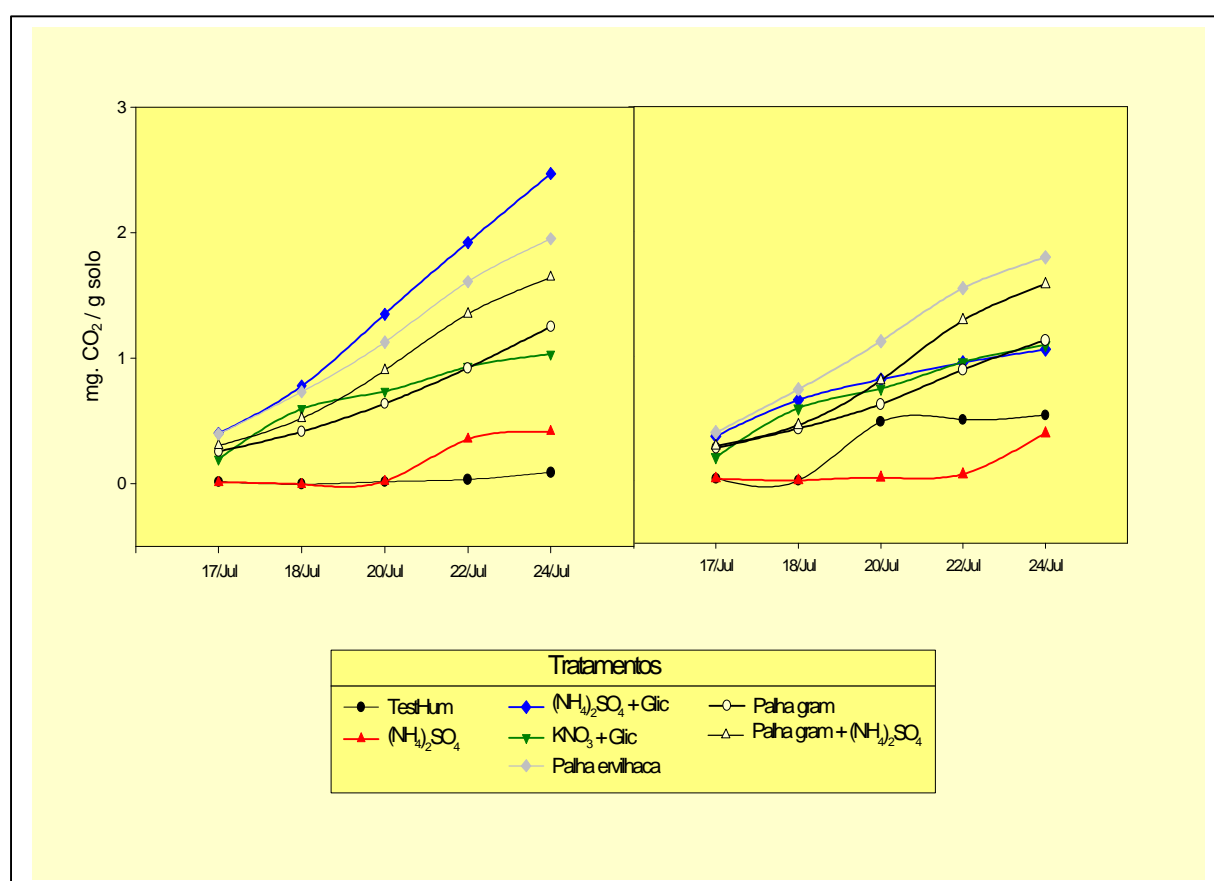
### Ensaio com plantio direto e convencional

Observou-se que, no solo sob plantio convencional, a quantidade de CO<sub>2</sub> (Figura 3), liberada no tratamento testemunha foi muito baixa e praticamente nula, durante o período de incubação, demonstrando claramente uma menor atividade microbiana. Isto se deve, provavelmente, devido a manipulação do solo durante o preparo das amostras, por exemplo quando secou-se as amostras à sombra, lembrando que a biomassa microbiana é altamente dependente da umidade

do solo e neste processo ela diminui drasticamente quanto ao inóculo microbiano nativo.

No solo procedente de sistema de plantio direto observamos um pequeno aumento na atividade microbiana no tratamento testemunha, no quarto dia de incubação, a partir do qual estabilizou-se.

O efeito da adição de resíduos de colheita (palha de ervilhaca ou palha de aveia) tiveram praticamente o mesmo comportamento em ambos sistemas. A única diferença foi observada quando adicionou-se glicose +  $\text{NH}_4$ . No sistema de plantio convencional os valores de  $\text{CO}_2$  liberado foram praticamente duas vezes maiores que no sistema de plantio direto, sendo que, no primeiro sistema, o tratamento com adição de glicose + amônio, superou em mais de 100% o tratamento com adição de glicose + nitrato, enquanto que no plantio direto ambas as fontes de nitrogênio apresentaram um mesmo comportamento. Estes resultados levam a pensar que a relação C/N do resíduo de colheita foi mais importante para a



**Figura 3.** Evolução do  $\text{CO}_2$  da população microbiana do solo sob plantio convencional e direto.

foi mais importante para a velocidade de decomposição. Ao se aplicar glicose + nitrato, o CO<sub>2</sub> liberado apresentou os menores valores entre os dois sistemas. Conhecendo-se que o nitrato não é a fonte de nitrogênio preferencial utilizada pelos microorganismos, pode-se, assim, deduzir que o N amoniacal do solo não foi suficiente para garantir o incremento do crescimento microbiano para degradar glicose. Quando adicionou-se NH<sub>4</sub> (fonte de nitrogênio preferida pela biomassa), a glicose foi rapidamente consumida. Adicionalmente pode-se observar que palha de ervilhaca (C/N = 22) é decomposta mais rapidamente que a palha de aveia (C/N = 45), o que pode estar associado a uma menor relação C/N de ervilhaca, comparado a aveia. Observou-se que a adição de NH<sub>4</sub> + aveia elevou a velocidade de degradação deste resíduo de colheita em relação ao tratamento onde não adicionou-se amônio. Além disso, os menores valores de CO<sub>2</sub> liberado dos tratamentos de adição de palha, comparado com glicose + amônio, pode ser explicado pela natureza química dos compostos carbonatos (celulose, lignina, etc.) destes materiais, que por estarem mais polimerizados, estariam menos disponíveis ao ataque microbiano.

A grande diferença entre os solos dos dois sistemas é que no sistema de plantio direto existiria um maior equilíbrio entre os componentes microbianos de tal forma que o sistema fica mais conservativo em relação a preservação/acúmulo de carbono (húmus). Em plantio convencional é provável que tenha promovido um desenvolvimento de microorganismos eficientes na assimilação de amônio. Estes resultados poderiam explicar, em parte, porque no plantio convencional a matéria orgânica se oxida mais facilmente, o que foi sempre atribuído ao efeito físico do preparo do solo, que favorece a aeração do sistema, mas também, pode ser consequência da adição de substâncias amoniacais incrementando o efeito.

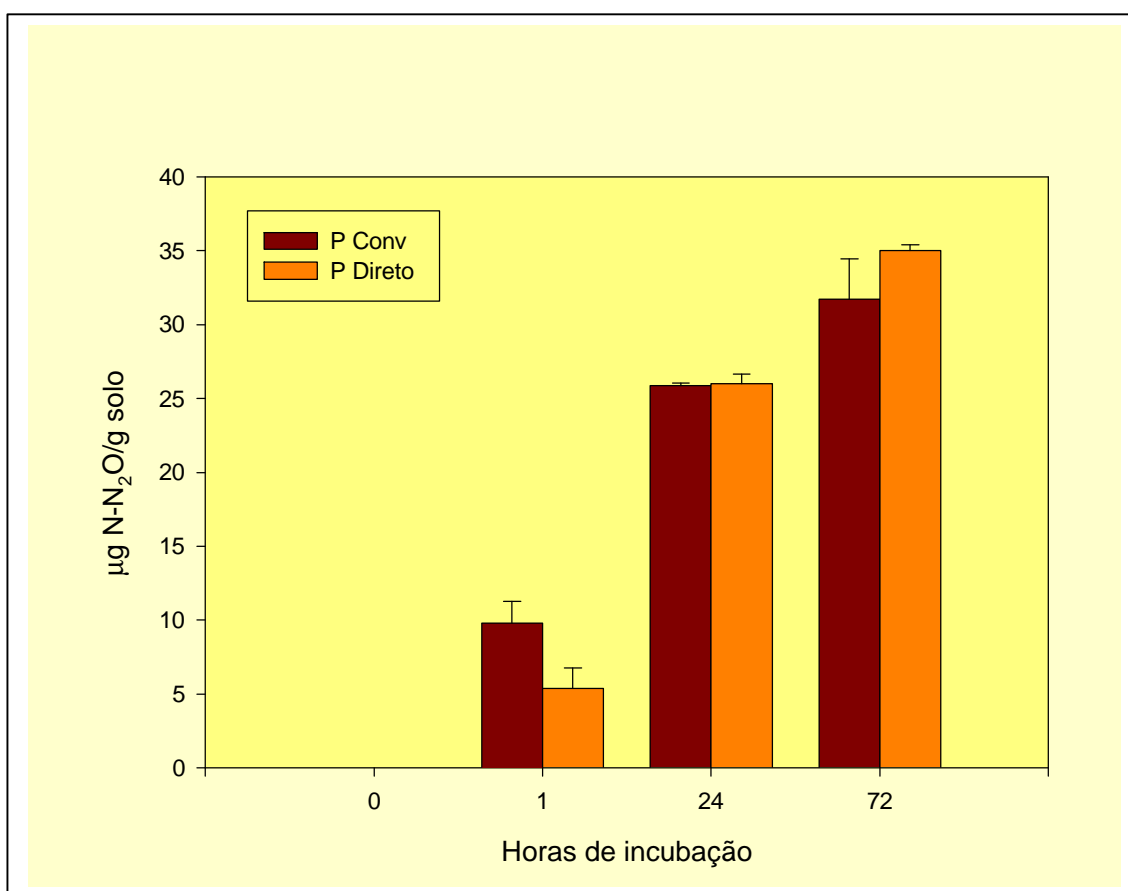
Comparou-se também o potencial de desnitrificação e NMP de desnitrificadores nos dois sistemas, não sendo observadas grandes diferenças entre os potenciais de desnitrificação entre os tratamentos avaliados nos dois sistemas. O tamanho da população também não diferiu significativamente entre os dois sistemas de plantio estudados. Sendo que no plantio convencional observou-se crescimento até a diluição 10<sup>-7</sup>, porém, a variação entre as contagens foram muito grandes. Avaliou-se também a concentração de nitrato presente nos tubos de ensaio do NMP,

sendo que os menores valores foram encontrados no meio de cultura correspondente ao solo sob plantio direto.

**Tabela 3.** Concentração de  $\text{NO}_3$  e percentagem de tubos com crescimento de desnitrificadores provenientes de solos sob plantio direto e convencional.

	P. Direto		P. Convecional	
Diluição	%TC	$\text{NO}_3$	%TC	$\text{NO}_3$
-2	100	0	100	0
-3	100	0	100	0
-4	100	38	100	51
-5	100	70	100	61
-6	80	54	100	66
-7	0	51	60	71
-8	0	42	0	62
-9	0	59	0	66

%TC= % de tubos com crescimento;  $\text{NO}_3$ = em ppm



**Figura 4.** Desnitrificação potencial de solos sob plantio direto e convencional

Através da evolução de N-N<sub>2</sub>O (em um período de 72 horas) observou-se tendência maior desnitrificação em solos sob plantio direto. Estes resultados são bastante condizentes com a literatura onde, em solos sob plantio direto dariam-se melhores condições para desnitrificadores que em solos cultivados em sistema convencional (Figura 5).

## 5. LITERATURA CITADA

- ANDRADE, D.S.; MIYAZAWA, M.; HAMAKAWZ, P.J. Microrganismos amonificadores e nitrificantes. In: Hungria, M.; Araújo, R.S. **Manual de métodos empregados em estudos de microbiologia agrícola**. Embrapa, Brasília. 1994. pp.355-369.
- BROOKES, P.C.; LANDMAN, A.; PRUDEN, G.; JENKINSON, D.S. Chloroform fumigation and the release of soil N: a rapid direct extraction method to measured microbial biomass N in soil. **Soil Biol. Biochem.** V.17, p.837-842, 1985
- CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.
- CARTER, M.R.; RENNIE, D.A. Microbial biomass as an index for tillage-induced changes in soil biological properties. **Soil Tillage Res.**, v.7, p.29-40, 1986.
- CASTRO, O.M. de. **Preparo de solo para a cultura do milho**. Campinas: Fundação Cargill. 1989. 41p.
- COCHRAN, W.G. Estimation of bacterial densities by means of the "Most Probable Number". **Biometrics**, p.105-116, 1950.
- CRUTZEN, P.J. Atmospheric chemical processes of the oxides of nitrogen, including nitrous oxide. In: Delwiche, C.C. (ed.). **Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide**. New York, John Wiley. p.17-44, 1981.
- DeMAN, J.C. MPN tables, corrected. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.17, p.301-305, 1983.
- GAMA-RODRIGUES, E.F. da; GUERRA, J.G.M.; ALMEIDA, D.L. de; DE-POLLI, H. Biomassa microbiana de carbono de solos de Itaguaí (RJ): comparação entre os métodos fumigação-incubação e fumigação-extração. **R. Bras. Ci. Solo**, v.18, p.427-432, 1994.
- HART, S.C.; STARK, J.M.; DAVIDSON, E.A.; FIRESTONE, M.K. Nitrogen mineralization, immobilization and nitrification. In: Weaver, R.W. (ed.) **Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and Biochemical Properties**. Soil Science Society of America, Inc. 1994. pp. 985-1017.



- JANSSEN, B.H. Nitrogen mineralization in relation to C:N ratio and decomposability of organic materials. **Plant and Soil**, v.181, p.39-45, 1996.
- JENKINSON, D.S. & LADD, J.N. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. In: PAUL, E.A. & LADD, J.N. (eds.). **Soil Biochemistry**. v.5, p.415-471, 1981.
- JENKINSON, D.S. & POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. I. Fumigation with chloroform. **Soil Biol. Biochem.**, v.8, p. 167-177, 1976a .
- JENKINSON, D.S. & POWLSON, D.S. The effects of biocidal treatments on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. **Soil Biol. Biochem.**, v.8, p.209-213, 1976b.
- KROEZE, C. **Global warming by halocarbons and nitrous oxide**. PhD Thesis, University of Amsterdam, pp.187, 1993.
- MACEDO, M.C.M.; EUCLIDES, V.P.B.; De OLIVEIRA, M.P. **Seasonal changes in the chemical composition of cultivated tropical grasses in the savannas of Brazil**. In: Proceedings of the XVII Inter. Grassland Congress. 18-21 de fevereiro de 1993. pp.2000-2002. Rockhampton, Austrália.
- MOSIER, A.R. Chamber and isotope technique. In: Andreae, M.O.; Schimel, D.S. (eds.) **Exchange of trace gases between terrestrial ecosystem and the atmosphere**. Chichester, John Wiley and Sons, p.175-187, 1989.
- MOSIER, A.R.; MACK, L.K. Gas chromatographic system for precise, rapid analysis of N<sub>2</sub>O. **Soil Sci. Soc. Am. J.**, v.44, pp. 1121-1123, 1980.
- MUZILLI, O. Influência do sistema de plantio direto, comparado ao convencional sobre a fertilidade da camada arável do solo. **R. Bras. Ci. Solo**, v.7, p.95-102, 1983.
- MYERS, R.J.K.; ROBBINS, G.B. Sustaining productive pastures in the tropics. V. Maintaining productive sown grass pastures. **Trop. Grassl.** v.25, p.104-110, 1991.
- PAUL, E.A. & CLARK, F.E. **Soil microbiology and biochemistry**. California: Academic Press, 1989. 275p.
- POWLSON, D.S.; BROOKES, D.C.; CHRISTENSEN, B.T. Measurement of microbial biomass provides as early indication of changes in total soil organic matter due to straw incorporation. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.159-164, 1987.
- RICE, C.W.; TIEDJE, J.M. Regulation of nitrate assimilation by ammonium in soils and isolated soil microorganisms. **Soil Biol. Biochem.**, v.21, p.597-602, 1989.

- SPARLING, G.P.; WEST, A.W. Modifications to the fumigation-extraction technique to permit simultaneous extraction and estimation of soil microbial C and N. **Comm. Soil Sci. Plant Annal.** V. 19, p.327-344, 1988.
- TATE, K.R.; ROSS, D.J. & FELTHAM, C.W. A direct extraction method to estimate soil microbial C: effects of experimental variables and some different calibration procedures. **Soil Biol. Biochem.**, v.20, p.329-335, 1988.
- VANCE, E.D.; BROOKES, P.C.; JENKINSON, D.S. An extraction method for measurement soil microbial biomass C. **Soil Biol. Biochem.**, v.19, p.703-707, 1987.
- VICTORIA, R.L., PICCOLO, M.C., VARGAS, A.A.T. O ciclo do nitrogênio. In: CARDOSO, E.J.B.N., TSAI, S.M., NEVES, M.C.P. (Coords.). **Microbiologia do solo**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 1992. 360p.